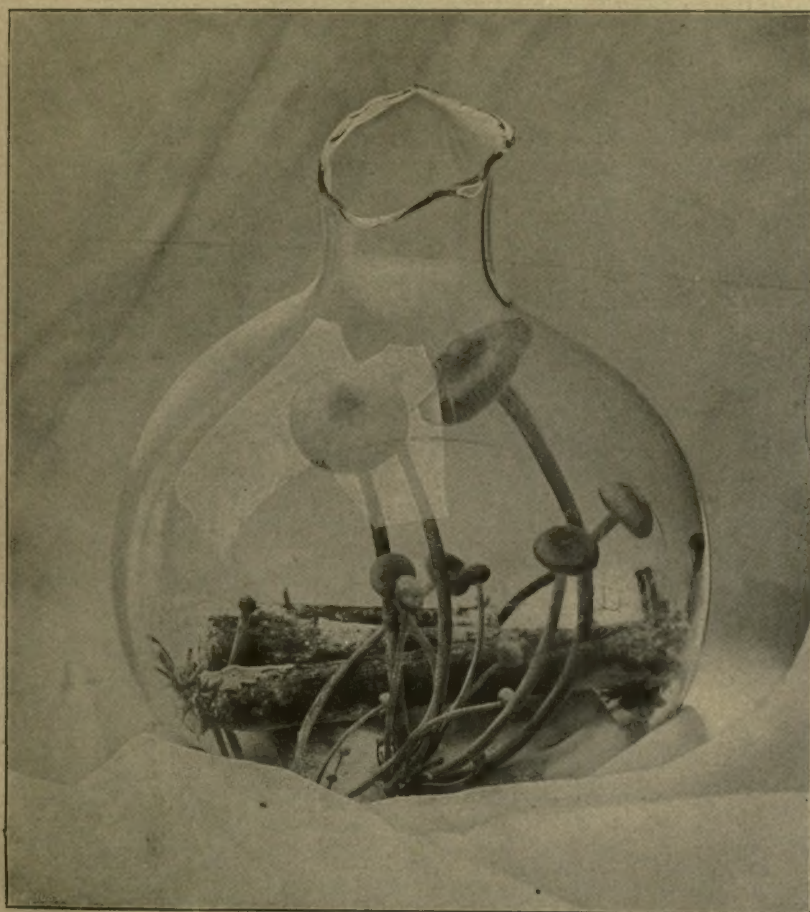
Nederlandsche Mycologische Vereeniging
Mededeelingen.
5 (May 1913)

OVER DE SPORENKIEMING EN HET KWEEKEN VAN PADDENSTOELEN

:: DOOR ::

CATH. COOL







MEDEDEELINGEN

:: VAN DE ::

NED. MYCOLOGISCHE

:: VEREENIGING ::

V.

MEI 1913.

OVER DE SPORENKIEMING EN HET KWEEKEN VAN PADDENSTOELEN.


AAROM, kan ik niet precies zeggen, maar van het oogenblik af, waarop ik met de studie der paddenstoelen begonnen ben, heb ik geloofd dat al die verschillende vruchtlichamen kiembare sporen afwerpen, die, op den grond of elders aangeland, na korten of langeren tijd ontkiemen. De eerste jaren heb ik dan ook heel wat rijpe paddenstoelen, en niet de minst mooi gekleurden, de echte humus-paddenstoelen naar mijn tuin gesleept om ze daar te zaaien; en in mijn verbeelding zag ik daar dan ieder najaar weer een klein „paddenstoelparadijs" verrijzen. Maar och heden, nooit is er ook maar één soort van verschenen. Erg nieuwsgierig was ik daarom naar ervaringen van andere menschen op dit punt. Het stuk van den heer Heimans in *De Levende Natuur*, afl. 7 1908, „Paddenstoelen kweeken", getuigt dat deze al evenmin succes had als ik.

Toen ik dan ook op 't „Phytopatologisch Laboratorium" in Amsterdam kwam te werken in lagere zwammen en daar ook een massa litteratuur over hoogere paddenstoelen tot mijne beschikking kreeg, was mijn eerste werk daar eens verschillende auteurs op na te lezen.

Ofschoon het reeds sinds 't begin der 18e eeuw, een bekende zaak was, dat de paddenstoelen sporen voortbrachten, zoo is er nadien over de *ontwikkeling* van de vruchtlichamen en de *sporen* vrijveel geschreven, over de *kiembaarheid* der sporen slechts heel weinig. Misschien was men in 't algemeen van 'tzelfde geloof als ik, dat alle sporen kiembaar zouden zijn, maar daar staat weer tegenover, dat men al sinds de oudste tijden wist, hoe moeilijk het was om eetbare paddenstoelen te kweeken.

De Bary, een der groote baanbrekers van de Mycologie, zegt over de kiembaarheid van de sporen der echte paddenstoelen in zijn boek „Morphologie und Biologie der Pilze" (1884) o. a.: „Was die Keimung der Hymenomyceten

speziell anbelangt, gibt es noch viele Pilzsporen von welchen noch keine Keimung beobachtet worden ist. Hier seien nur beispielsweise die Basidiosporen der meisten Gastromyceten, Phalloideen, Lycoperdeen, Hymenogastreen, die Ascosporen von Tuber, Elaphomyces und verwandten Genera genannt; auch vom Agaricus campestris liegt zum Beispiel keine sichere Keimungsbeobachtung vor".

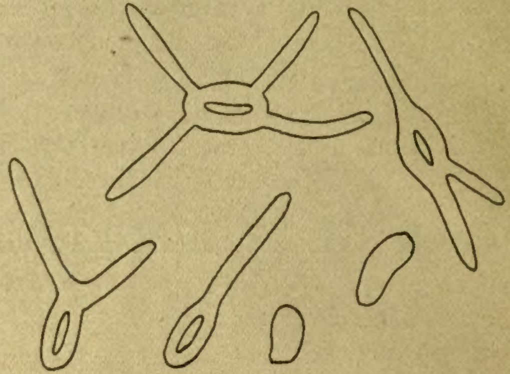


Fig. 1. Ontkiemende sporen van de houtzwam: 't fluweelpootje, Collybia velutipes.

Hij is echter lang de eerste niet, die over kiemende paddenstoelensporen schrijft. In 1859 geeft Hoffmann in een stuk getiteld „Ueber Pilzkeimungen" beschrijvingen en teekeningen van vele kiemende paddenstoelensporen. Zoo geeft hij die o.a. van een stuifzwamsoort die, door latere auteurs en ook door mij, niet kiemend is bevonden. Zijn beschrijvingen zijn heel kort en over een methode rept hij met geen woord. In 1877 verscheen van L. Eidam een stuk: „Die Keimung der Sporen und die Entstehung der Fruchtkörper bei den Nidularieen." Deze kreeg de sporen der Nidularieen kiemende en nu zou men uit den titel opmaken dat hij uit die kiemende sporen zijn mycelium en vruchtlichamen kreeg. Doch dan vergist men zich want (in zijn tijd was de reinkultuurmethode nog niet bekend) de uit de sporen verkregen kultuur verontreinigde en daarom zocht hij in 't bosch maar naar jonge vruchtlichamen wier ontwikkeling hij nu thuis kon vervolgen!

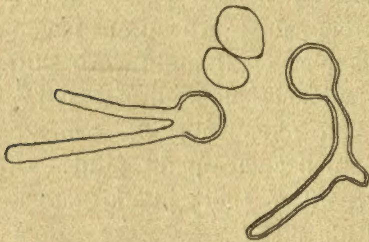


Fig. 2. Kiemende sporen van Russula nigricans uit reeds rottende exemplaren.

Zeer belangwekkend zijn de van veel lateren datum zijnde beschrijvingen van R. Falck, over de sporenkieming in zijn beide stukken „die Sporenverbreitung bei den Basidiomyceten und der biologische Wert der Basidie" en „Die Cultur der Oidien und ihre Rückführung in die höhere Fruchtform bei den Basidiomyceten".

Lindau zegt in het bekende systematiekboek van Engler en Prantler: „Natürliche Pflanzenfamilien" dat alle Ascomycetensporen kiemen.



Fig. 3. In humusdecoct tot een kiemblaasje kiemende sporen van Amanita mappa.

Dan volgen ten slotte de breede onderzoekingen van Prof. Oscar Brefeld die al zijn ervaringen daaromtrent heeft neergelegd in zijn werken: „Bot. Untersuch. über Schimmelpilze" en „Untersuch. aus dem gesammt Geb. der Mykologie", verscheidene dikke deelen vol, die, wel is waar wat heel uitvoerig, om niet te zeggen wat taai zijn om te lezen, maar toch zeer zeker iemand opwekken om

zijn werk na te volgen en voorttezetten. Hij heeft van de 200 soorten van echte paddenstoelen, die hij op de kiembaarheid der sporen onderzocht, 160 kiembaar gevonden doch.... deze behoorden meest allen tot de houtbewonende soorten. Volgens hem brengen de *op* en *in* den grond (truffels) levende paddenstoelen geen kiembare sporen voort. Hij voegt er bij, dat ze misschien na een rustperiode tot kieming te brengen zijn. Aangezien nu de meeste echte paddenstoelen behooren tot de op den grond levende soorten, zouden we hier volgens Brefeld's overtuiging kunnen zeggen, dat al die duizenden mooie natuurgewrochten voor niets hun sporen produceeren!

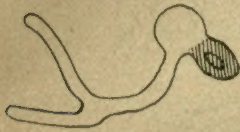


Fig. 4. Spoor van de bruinsporige: Galera hypnorum; kiemende, eerst met een kiemblaas.

Na Brefeld is er op de verschillende Laboratoria van Europa en Amerika nog vrij veel in de hoogere zwammen gewerkt, echter niet bepaald meer met 't doel om de sporen op haar kiembaarheid te onderzoeken.

Zoo onderzocht J. Fuchs [1]) eenige humuspaddenstoelen op hun mycorrhiza met boomen en vertelt hij, dat hij o. a. de sporen kiemende kreeg van 2 echte humuspaddenstoelen, n.l. van een Tricholoma en een Lactariussoort. Echter het mycelium dat volgens hem uit de sporen groeide, stierf spoedig af. Een Amerikaansche dame, miss Ferguson, kreeg wat nog nooit iemand vóór haar gelukt is, de sporen van Agar. campestris kiemende, door dat zij tusschen de sporen, stukjes weefsel van dien paddenstoel bracht!

G. R. Lyman, geeft in zijn „Culture studies on polymorphism of Hymenomycetes" dat hij 70 verschillende paddenstoelen uit sporen kweekte, doch... deze behoorden allen weer tot de houtzwammen.

En nadat ik nu al deze collega's geraadpleegd had, besloot ik zelve eens een uitgebreid onderzoek naar die kiembaarheid in te stellen.

Is het voor 't kweeken van paddenstoelen noodzakelijk te werken op en met materiaal van een Laboratorium, niet alzoo, voor kiemingsproeven waarvoor een ieder zich bij zich thuis kan inrichten.

Volgens Brefeld's methode maakte ik gebruik van de z.g.n. „vochtigekamers". Hiervoor heeft men noodig een voorwerpglas, een glazen ring en een dekglaasje 24: 32 mM. De ring wordt met een weinig vaseline vastgemaakt op 't voorwerpglaasje en 't dekglaasje later eveneens met vaseline op den ring vastgekleefd tot afsluiting van de lucht. Op dat dekglaasje in de z.g.n. hangende druppel van de een of andere vloeistof worden nu de te onderzoeken sporen gebracht. Een druppel water in den ring

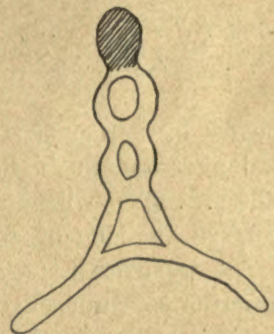


Fig. 5. Met groote kiemblaas kiemende spoor van Psatyrella disseminata (een zwartsporige).

[1]) Über die Beziehungen von Agaricineen und anderen humusbewohnende Pilzen zur mycorrhizenbildung der Waldbäume.

op 't voorwerpglas gebracht, behoedt de kultuur voor uitdroging. Onder het microscoop kan men zoodoende de geheele ontkieming van de sporen volgen.

Brefeld ging voor zijn kiemingsproeven altijd uit van één enkele spoor, doch daar 't mij op den duur gebleken is, dat steriele en fertiele sporen gemengd voorkomen, nam ik daarvoor meerdere, meestal zelfs vele sporen, die ik op een straks te beschrijven manier, van het rijpe vruchtlichaam op 't dekglaasje opving.

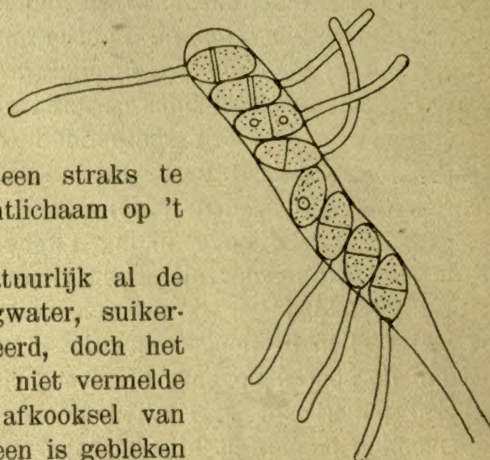


Fig. 6. Reeds in de Ascus kiemende sporen van de Ascomyceet Peziza Willkommii (de veroorzaker van de Larix-kanker).

Voor kiemingsvloeistof werden natuurlijk al de door de boeken opgegevene als leidingwater, suikerwater, aangezuurd water enz. geprobeerd, doch het allerbeste beviel daarvoor de door hen niet vermelde kiemingsvloeistof: pruimendecoct (een afkooksel van gedroogde pruimen, gefiltreerd). Niet alleen is gebleken dat deze zuur-zoete vloeistof een geliefkoosd voedsel voor de zwammen is, doch tevens houdt zij hare vijanden: bacteriën en gisten, die meer het zoete der aarde beminnen, van zich verwijderd.



Fig. 7. Op tweeërlei manieren kiemende sporen van de trilzwam »Exidia glandulosa«. Bij *a* met z.g.n. Conidiën, bij *b* met gewone Myceliumdraden.

En nu werd er geëxperimenteerd met de meest uiteenloopende paddenstoelensoorten, wel ruim 170 in getal. Natuurlijk werd er niet steeds op dezelfde manier gewerkt, en niet met maar één kultuur van dezelfde soort, doch met meerderen tegelijk. Alles werd in 't werk gesteld om kieming te verkrijgen. De „vochtigekamers" werden in verhoogde of verlaagde temperatuur, in 't donker en in 't licht gezet enz. Echter... al die wijzigingen hielpen niet veel, ze kiemden of ze kiemden niet en dat wel over 't algemeen bij gewone kamertemperatuur en onder afsluiting van 't licht, na 1—4 dagen en daarna, enkele uitzonderingen buitengesloten, niet meer. Zoo als gezegd is was pruimendecoct *het* kiemende medium voor de houtpaddenstoelen en de humusdito's die wilden kiemen; echter, de meesten die daarin kiemden, deden

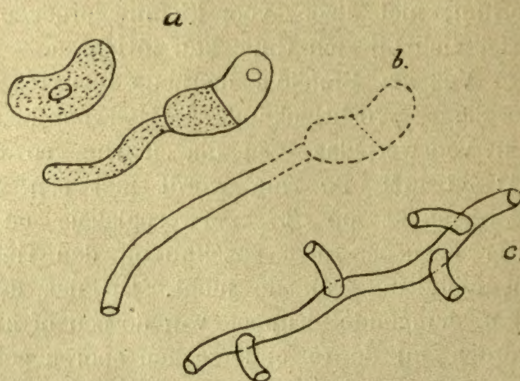


Fig. 8. Kiemende spoor van het Judasoor: Hirneola Auricula Judae. Bij *b* is de spoor zelf geheel door 't groeiende mycelium uitgezogen, dat zich spoedig gaat vertakken (*c*).

dat eveneens in leidingwater ofschoon minder vlug dan in het pruimennat. De echte mestpaddenstoelen kreeg ik echter pas tot kieming, doch toen ook allen, nadat ik ze gebracht had in een aftreksel van paardenmest.

En 't resultaat was als volgend: op hun kiembaarheid werden onderzocht: *ten eerste* 154 Basidiomyceten, waarvan er 58 behoorden tot op hout of boomen groeiende soorten. Van deze houtzwammen kiemden er 42 dat is ± 70%. Van de overigen 96 behoorden er 6 tot de op mest groeiende soorten, die allen kiemden, en de andere 90 waren echte op den grond groeiende of humuspaddenstoelen, waarvan er slechts 10, dat is ± 11%, kiemden. *Ten tweede*: 19 Ascomyceten waarvan er 4 behoorden tot de houtzwammen; hiervan kiemden er 3, dus 75% en 15 tot de humuszwammen waarvan er 4, dat is ± 24%, kiemden. Totaal

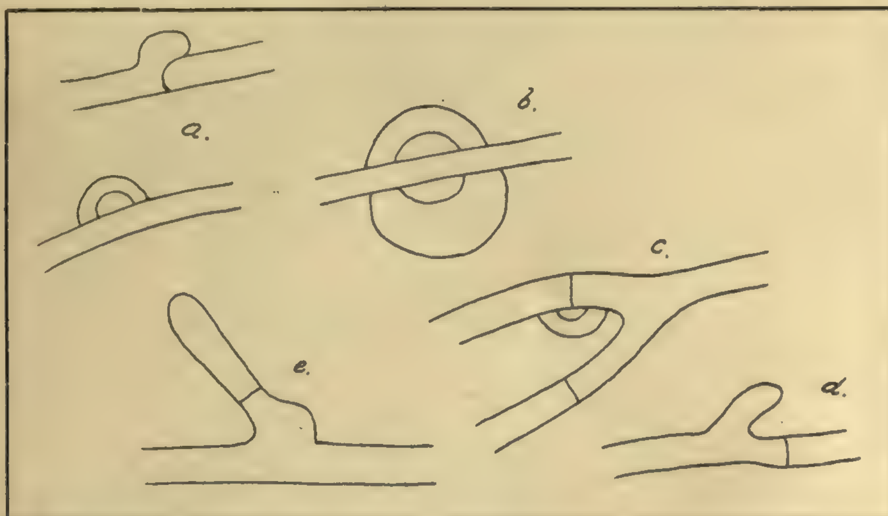


Fig. 9. Z.g.n. Lussen (Schnallen-cellen) van 't mycelium. Bij *a b* en *c* nog gesloten, bij *d* en *e* tot vertakkingen van 't mycelium uitgroeiend.

werd geëxperimenteerd met 62 houtzwammen, waarvan er 45, dat is ruim 71% en met 105 humuszwammen, waarvan er 15, dat is ruim 14%, kiemden. Onmogelijk is het alle kiemende soorten op te noemen en ik zal mij dus bepalen tot die der echte humuspaddenstoelen. Dit waren van de Basidiosporen: witsporigen: Lepiota meleagris, een paddenstoel, die in broeikassen voorkomt. Collybia atrata, een paddenstoel, dien ik op een kouden Decemberdag nog buiten vond. Russula nigricans (fig. 2), n. l. sporen uit reeds geheel zwarte, half verrotte exemplaren (sporen van frissche exemplaren kiemden niet). Marasmius urens een boschmarasmius en Marasmius oreades, de bekende weideheksenkring-paddenstoel. Drie bruinsporigen: n.l. Galera hypnorum, het kleine geel-bruine paddenstoeltje, dat zeer veel, en op mos groeiende, gevonden wordt; Bolbitius vitellinus, een minder algemeene paddenstoel van wegranden en Pholiota praecox, zooals de naam

reeds zegt, een voorjaars Pholiota, die in weilanden en duinen vrij algemeen voorkomt. Van de zwartsporigen, de zeer algemeen zijnde, zoo fraai kopergroene, kleverige Stropharia aeruginosa. Echter niet alle exemplaren van deze paddenstoelen hebben kiembare sporen, ik vond er velen bij, wier sporen de kieming weigerden. Dan nog de sporen van de kleine stinkzwam: Phallus caninus. Van de Ascomyceten de twee onderzochte morielje-soorten: Morchella esculenta en rimosipes die, even als de 3e kiemende en minder algemeene voorjaarszwam uit de duinen, Verpa digitaliformis, tot de echte humuspaddenstoelen behooren en toch reeds in water tot kieming te brengen waren. De vierde kiemende Ascomyceet is de, op afgevallen dennennaalden groeiende, zwarte Peziza nigrella; doch die andere, in onze bosschen, weilanden enz. ieder jaar zoo sterk vertegenwoordigde paddenstoelengeslachten, als Amanita's, Lepiota's, Russula's, Tricholoma's, Lactaria's, Collybia's, Hygrophori, Cantharellen, *alle* rose en de meeste bruinsporigen en vele zwartsporigen, de boletussoorten, benevens alle stekel-, koraal- en stuifzwammen waren, voor zoover ik ze onderzocht heb, niet tot ontkieming te brengen, ook niet, wat ik reeds met enkelen geprobeerd heb, nadat de sporen een rusttijd hadden doorgemaakt, wat ook Brefeld en anderen zonder succes reeds gedaan hebben.

Behalve de reeds genoemde kiemingsvloeistoffen gebruikte ik ook nog voor niet kiemende humuspaddenstoelen een gesteriliseerd aftreksel van humus (bladeren en aarde) en kreeg daarbij tot eenig resultaat, dat ik de sporen van Amanita mappa tot een kiemblaasje kon brengen (fig. 3.) Echter deze proeven zijn nog te kort genomen om er reeds een beslist oordeel over te vellen. Hetzelfde moet ik zeggen van een ander onderzoek, dat ik in navolging van een Italiaan, Voglino geheeten, deed. Deze vertelt in een stuk, getiteld „Nota micologica" (1891), dat hij in slakkenmagen kiemende sporen gevonden heeft van de anders niet kiemende Russula-, Lactarius- en Tricholoma-soorten. De slakkenmagen zelf heb ik er nog niet op onderzocht, doch dezen zomer heb ik mij gedurende een verblijf in de zoo mooie, paddenstoelen- en ook slakkenrijke Bentheimer bosschen, onledig gehouden met de excrementen der paddenstoelen-etende slakken te verzamelen en te onderzoeken. Ik vond er in: sporen van Russula, Lactarius en Boletussoorten, doch geen enkele in kiemende toestand, evenmin waren zij na dus de slakkenmaag gepasseerd te zijn, tot kieming te brengen. Voglino vond ook in de ingewanden van padden, kiemende sporen van Hymenomyceten.

Ook zijn er nog proeven te nemen met een methode, die de Amerikaansche Prof. B. M. Duggar in zijn aardig boekje „The principles of Mushroom growing and mushroom spawnmaking," geeft, nl. om bij de voedingsvloeistof kleine hoeveelheden van een mineraal en wel een magnesiumphosphiet te doen. Hij komt er echter mede tot 't resultaat, dat niet kiemende ook daarmee niet kiemen.

En zoo heb ik het dus met mijn onderzoekingen al niet veel verder kunnen brengen dan mijn voorgangers en zou ik dus met hen tot 't besluit moeten

komen, dat: *op den grond groeiende paddenstoelen geen kiemende sporen voortbrengen* Doch.... ik zou zooiets niet gaarne willen beweren, integendeel blijf ik mijn eerste opinie vasthouden en geloof ik dat ze wel degelijk kunnen kiemen, maar, *dat wij de natuurlijke omstandigheden waaronder zij kiemen, eenvoudig niet kunnen namaken.* Wellicht spelen bacteriën of andere lagere organismen hierbij een rol. We zouden moeten experimenteeren b.v. met een ongekookt aftreksel van humus



Fig. 10. Reinkultuur uit sporen van Collybia velutipes, het »fluweelpootje« op takken van eschdoorn.

of op die humus zelve, maar als men bedenkt, dat zelfs de kulturen der vochtige kamers waar zoo steriel mogelijk meegewerkt wordt, reeds spoedig verontreinigen dan begrijpt een ieder wel dat zooiets niet uit te voeren is.

Het is soms zoo onbegrijpelijk: waarom b.v., kiemen de sporen van de weide-heksenkringzwam, Marasmius oreades, reeds in water, terwijl de onder dezelfde omstandigheden naast haar groeiende Champignon, Psall. camp., bij alle

mogelijke proeven niet tot kieming te brengen is. Meerdere menschen hebben mij echter verzekerd dat zij Champignons gezaaid hebben op weilanden waar nog nooit Champignons waren voorgekomen en dat zij er 't jaar daarna, massa's konden plukken. Ik zelf probeerde 't ook met de meeste zorg, doch zonder resultaat.

En dan, waarom kiemt Phallus caninus nu wel, en de groote stinkzwam Ph. impudicus, groeiende in dezelfde bosschen, niet. Waarom alle Tricholoma's niet en dan in eens de op hout groeiende Trich. rutilans, die precies denzelfden bouw en dezelfde sporen heeft als al die anderen, weer wel? Waarom, terwijl de meeste houtpaddenstoelen zoo gemakkelijk tot ontkieming te brengen zijn, weigeren dan andere echte dito's, zoo als o. a. de bekende „tonderzwam", de Fomes-soorten en de „biefstukzwam", Fistulina hepatica, weer totaal de kieming?

We staan hier voor vele vraagstukken, die misschien in den loop der tijden, misschien ook nooit, opgelost zullen worden!

In elk geval kan ik een ieder aanraden, die de studie der Mycologie beoefent, ook dit kiemingswerk eens ter hand te nemen. Als velen 't zelfde werk doen, vindt één van hen wellicht de ware methode en zeker zal niemand het verloren tijd achten, want, behalve het verrassende dat er in is gelegen, als er één kiemt en nog wel een humuspaddenstoel, komt daar dan nog bij de bestudeering van de verschillende vormen der sporen, zóó verschillend niet slechts in de onderlinge geslachten, doch zelfs bij naverwante soorten. Het kan zelfs bijdragen tot het verkrijgen van een betere systematische indeeling der paddenstoelen, waar nog groote behoefte aan is. Ook de verschillende manieren waarop de sporen ontkiemen, is zeer belangwekkend om na te gaan. De meesten zwellen vóór de kieming dikwijls tot $\times 1^1/_2$ op en ze kiemen meestentijds met meer dan één kiembuis (fig. 1). Het eerst gevormde mycelium is weinig vertakt enz. Merkwaardig is 't o. a. dat de zwartsporigen, ook enkelen der bruinsporigen, bij de ontkieming eerst een kleurlooze kiemblaas vormen, die dikwijls grooter is dan de spoor zelve. Uit deze kiemblaas groeit dan weer het mycelium. (fig. 4 en 5).

De meeste Ascomycetensporen die kiemden, deden dit reeds terwijl zij zich nog in de Asci bevonden. (fig. 6)

Terwijl ik mij zóó met deze kiemproeven onledig hield, kwam bij mij de begeerte boven, om het niet bij deze „vochtigekamerkulturen" te laten, doch om te probeeren de kiemende soorten verder te kweeken en er z. g. n. reinkulturen van te maken.

De meesten der opgenoemde auteurs die, om de een of andere reden de kieming der paddenstoelen hebben nagegaan, kweekten ze ook met minder of meer gunstig gevolg. Onder hen staat Brefeld bovenaan.

Is het al aardig om onder 't microscoop het kiemen der sporen te volgen, des te belangwekkender is het om er het mycelium, van één en denzelfden paddenstoel er onder te kunnen beschouwen en er de verschillende dingen aan te bestudeeren.

Buiten kunnen we dat mycelium als we den grond wat losmaken ook wel verzamelen, maar we weten dan niet, zelfs al komt het vlak bij den paddenstoel voor, of het werkelijk tot die soort behoort, want de paddenstoelen-myceliën verspreiden zich ver en door elkaar heen in den grond.

Bij de eerste kulturen, die men verkregen heeft, vertrouwt men zich zelf nog niet en, ofschoon ze microscopisch de bekende „schnallenzellen" (fig. 9) één van de typische kenmerken van het Hymenomyten-mycelium vertoonen, gelooft men toch nog met de een of andere z.g.n. verontreiniging te doen te hebben; dus dat men met veel zorg een kultuur gemaakt heeft van een schimmeltje, zoo als natuurlijk ook dikwijls gebeurt, vooral als men werkt in een Laboratorium waar n.l. vele lagere schimmels gekweekt worden zoo als dit in 't Lab. „Willie Commelin Scholten" het geval is. Maar dan op eens is die twijfel verdwenen, want, ziet, op het mycelium verheft zich in miniatuur eene herhaling van 't paddenstoeltje dat ge hebt uitgezaaid en als ge dan van de sporen van dat paddenstoeltje weer een kultuur hebt verkregen en deze ook weer opnieuw paddenstoeltjes geeft en dat alles soms in den korten tijd van 4 maanden, dan voelt men zich wel eenigszins trotsch, dat men dat de natuur zoo netjes heeft nagedaan. Maar laat ik ook over het kweeken van paddenstoelen wat uitvoeriger zijn.

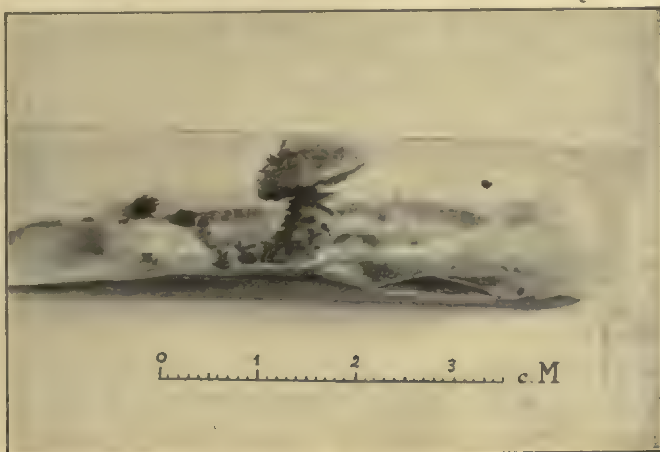


Fig. 11. Reinkultuur uit weefsel van Pholiota squarrosa, op kersen-agar in reageerbuisje.

Men zou zóó denken dat van alle paddenstoelen wier sporen tot kieming te brengen zijn, men gemakkelijk reinkulturen verkrijgt.

Dat dit nog niet meevalt, bewijst wel dat van de 66 kiemende soorten die bijna allen door mij in kultuur zijn genomen, ik in den tijd van 3 jaren slechts 22 reinkulturen verkreeg.

De oorzaak ligt hierin, dat zelfs jonge, frissche exemplaren behalve hun eigen sporen, vele sporen van lagere organismen als bacterien, gisten en schimmels herbergen.

Heel wat proeven werden dus genomen en heel wat teleurstellingen ondervonden, totdat ik tot mijn tegenwoordige methode van uitzaaien kwam, die nu bijna steeds dadelijk leidt tot 't verkrijgen van een reinkultuur van de uitgezaaide soorten.

Ik ontdoe hiervoor den rijpen, versch gezochten paddenstoel van den steel en

den hoedrand, in welken laatsten zich de meeste hierboven opgenoemde verontreinigingen bevinden en leg hem dan op een ring, gemaakt van steriele watten, geplaatst boven een steriel gemaakt groot dekglas (wat ik voor de vochtige kamers gebruik) of in een steriele glazen z.g.n. petrischaal.

Na eenige uren zijn er dan reeds genoeg sporen tot uitzaaiïng opgevallen.

Deze methode berust hierop, dat de sporen van de Basidio- en Ascomyceten worden geëjaculeerd of afgeworpen, terwijl het een eigenschap is van die der lagere 't meest tot de Phycomyceten behoorende zwammen, die als verontreinigingen in de hoeden aanwezig zijn, dat ze blijven kleven en dus niet mede op de glaasjes aanlanden.

De uitzaaiïng geschiedt dan verder volgens de z.g.n. „bacteriën reinkultuur methode". De sporen worden daarvoor met gedistilleerd water van de glaasjes afgegoten in een steriel glazen buisje en daarbij wordt dan gevoegd de z.g.n. voedingsbodem, die vloeibaar gemaakt en tot op 40° C. wordt afgekoeld. Dit mengsel wordt nu uitgegoten in gesteriliseerde petrischalen.

In die gestolde massa kiemen nu de sporen en meestal na een dag of 10 is het mycelium reeds duidelijk waar te nemen.

Het mycelium van de echte paddenstoelen is over 't algemeen wit van kleur en heeft de eigenschap dat het dikke vochtdruppels afscheidt, het z.g.n. „tranen" van 't mycelium, welk vocht wit, geel of bruin gekleurd kan zijn. Soms is deze vochtafscheiding zóó sterk, dat het geheele mycelium er door te niet gaat.

Voor voedingsbodem bleek pruimen- of kersensap hier nu vermengd met 2 % agar—agar, evenals voor het kiemen 't beste medium te zijn v.n.l. voor den groei van 't mycelium, ofschoon ook de meeste soorten hierop reeds hun vruchtlichamen maken. De meest normale hoeden kreeg ik echter voor de „houtzwammen" op haar natuurlijk substraat nl.: door in een glazen kolf of doos hout te steriliseeren op een laagje zand, dat vochtig kan gehouden worden en 't hout verhindert uit te drogen. Daarvoor bleek mij, ook alweer na allerlei proeven, versch gekapt hout van iep en eschdoorn 't beste (ook linde-, wilgen- en populierenhout voldeed goed).

Daar de meeste hout-paddenstoelen tot kieming te brengen zijn, ligt het voor de hand, dat de meeste door mij verkregen kulturen, die van op boomen of op houtgroeiende soorten zijn.

Mijn eerste paddenstoeltje, dat in de kultuur verscheen, was dat van Collybia velutipes, „de winterzwam" of „het fluweelpootje", dat van September tot Maart overal in ons land te vinden is op boomstammen, stronken en palen. Zooals de photo (fig. 10) aangeeft, gaf deze in kolf op takken van eschdoorn bijna normale vruchtlichamen en dit wel zoowat 't geheele jaar door.

Anders gedroeg zich de kultuur van Hypholoma fasciculare, het zoo algemeen in ons land voorkomende „zwavelkopje". Eerst tien maanden nadat 't mycelium op hout gebracht was, kwamen er, en wel op denzelfden tijd dat ze ook buiten zich vertoonden, tot 3 maal achter elkaar vrij normale vruchtlichamen voor den

dag. Evenzoo met „Pholiota squarrosa", de bekende mooie, schubbige parasiet van onze beuken (fig. 11.) wier vruchtlichamen in de kultuur al maandenlang in aanleg waren als heel kleine hoedjes, doch die pas tot bijna normale paddenstoelen uitgroeiden toen ook in de natuur de eerste exemplaren verschenen.

Lentinus tigrinus, een paddenstoel, die in de natuur slechts in den voorzomer op stronken en palen te vinden is, gaf in de kultuur niet alleen ruim 4 weken na de uitzaaiïng op kersen-agar al bijna normale vruchtlichamen, doch is deze bij voortduring blijven geven.

Bij de meeste kulturen kwamen al reeds na 5 of 6 weken na uitzaaiïng de vruchtlichamen te voorschijn op 't mycelium. 't Vlugste was hiermee de, op palen zoo algemeen voorkomende, „Polyporus versicolor" die in de uitgezaaide kultuur op den 18den dag reeds hoedjes vertoonde (fig. 12).



Fig. 12. Reinkultuur uit sporen van Polyporus versicolor op hout.
(Teneinde beter gephotographeerd te kunnen worden, is het stuk hout uit de kolf genomen).

Verdere kulturen van houtpaddenstoelen uit sporen kreeg ik nog van de Basidiomyceten: Armillaria mucida (fruct.) (fig. 13) Armillaria mellea (kultuur van pas een maand oud) Lenzites flaccida (fruct.) Mycena galericulata; Polyporus adustus en abietinus; Stereum purpureum, hirsutum (fruct.) en spadiceum; Merulius corium en tremellosus; Trametes gibbosa; Panus stipticus; Schizophyllum commune (fruct.); Phlebia aurantiaca, de op dennenkegels groeiende Hydnum auriscalpium (fruct.) Collybia conigena en van de Ascomyceten: Peziza nigrella, die op dennennaalden leeft en Bulgaria inquinans (fruct.). De opgevangen sporen der kiemende mestpaddenstoelen werden, om er kulturen van te verkrijgen wanneer ze met gedistilleerd water in de buisjes waren afgegoten, dadelijk op gesteriliseerden paardenmest in kolven of doozen uitgezaaid. Hiervan kreeg ik slechts kulturen van een Coprinussoort, die nog geen vruchtlichamen heeft gegeven en van Stropharia semiglobata, het aardige echte mest-paddenstoeltje met den kleverigen, klokvormigen gelen hoed, die voortdurend in de kultuur langgesteelde hoedjes omhoog zendt.

Van de kiemende humuspaddenstoelen (uitzaaiïng en voedingsbodem als bij de houtpaddenstoelen) gelukte 't mij van de volgende soorten kulturen te verkrijgen: Marasmius oreades, Stropharia aeruginosa, Pholiota praecox en Morchella esculenta.

Behalve de Morielje fructificeerden deze allen.

De zoo algemeen zijnde Marasm. oread., de weideheksenkring-paddenstoel, is

reeds door iemand vóór mij (Lindner) gekweekt, doch deze kreeg er geen vruchtlichamen van. Die van mijn kultuur waren wel niet normaal, doch gedurende den tijd dat deze paddenstoel buiten gevonden wordt, vertoonden zij zich op 't Laboratorium ook onafgebroken in groepjes op 't mycelium zooals de photo (fig. 14) aangeeft. Pholiota praecox, een paddenstoel, die zooals de naam aangeeft, zich in 't voorjaar vertoont en in de weilanden en ook in de duinen vrij algemeen is en meestal in heksenkringen groeit, gaf in één mijner kulturen ook een kringetje van miniatuurpaddenstoeltjes.

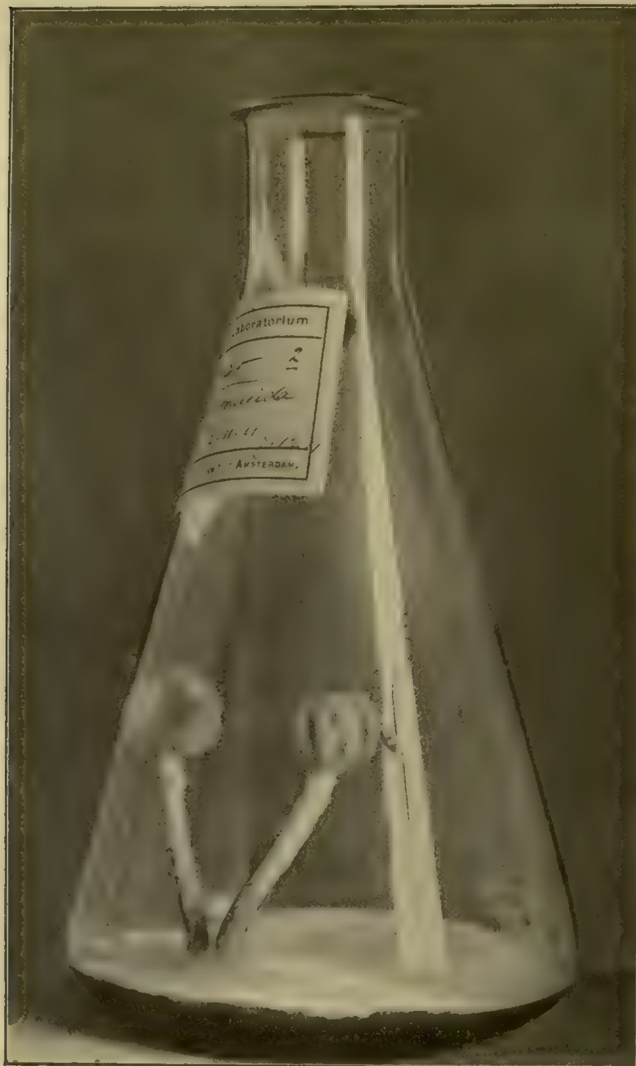


Fig. 13. Reinkultuur uit sporen van Armillaria mucida, de »porseleinzwam« op kersen-agar.

Met verlangen zie ik voor de Morielje 't voorjaar, haren natuurlijken groeitijd, te gemoet; wellicht dat dan ook in mijn kulturen die zonderlinge vruchtlichamen zich zullen verheffen [1]). Meerdere menschen hebben een Morieljekultuur gehad, echter niemand nog fructificeerend.

Natuurlijk is een mensch nooit tevreden met hetgeen hij reeds verkregen heeft en zoo voldeed het mij niet, dat ik, door dat zij geen kiembare sporen voortbrengen, van al die mooie humuspaddenstoelen geen kulturen zou kunnen verkrijgen.

Brefeld zegt in zijn boek, dat het volstrekt geen bezwaar is, dat de meeste humuspaddenstoelen geen kiembare sporen hebben. Je kunt, beweert hij, van *elken paddenstoel* een kultuur uit het weefsel daarvan maken".

[1]) Tot op heden, half Mei, geen morieljes in de kultuur verschenen.

Nu, mij is het gebleken dat dit nog volstrekt niet zoo gemakkelijk gaat. Wel ruim 150 soorten heb ik met de grootste zorg op die manier trachten te kweeken, echter slechts met dit resultaat, dat 't mij met een 20 tal soorten maar gelukt is.

De meeste humuspaddenstoelen hebben een zeer waterig weefsel, zoodat, als de kultuur na de enting van 't weefsel uit den paddenstoel, werkelijk schimmel-, bacteriën- of gistvrij is gebleven men 't weefsel om zoo te zeggen ziet wegsmelten op den voedingsbodem. Alleen daarvoor geschikt zijn die soorten met vast vleesch, zooals ten eerste de vleezige buisjeshoutzwammen bezitten en ten tweede ook diè humuszwammen, die als zeer jonge exemplaren te verzamelen zijn, zooals o.a. de Amanita's, Psalliota's (champignons), de nog gesloten aardsterren, de eieren der stinkzwammen enz.. Al die Russula, Lactarius, Hygro-



Fig. 14. Reinkultuur uit sporen van Marasmius oreades in petrischaal op kersen-agar.

phorus soorten o.a. bezitten weefsels, waarin absoluut geen groeikracht aanwezig is.

Om die weefselkulturen te verkrijgen, worden de zoo jong en zoo versch mogelijk verzamelde exemplaren zorgvuldig afgewasschen met een zwakke formalin-oplossing en met een steriel gemaakt mes doorgesneden. Dan wordt zoo vlug en steriel mogelijk, een stukje uit hoed of steel genomen en dit op den voedingsbodem neergelegd. Ook hiervoor bleek weer kersen-agar de beste te zijn, en 't mycelium van de houtzwammen groeide daarop evensnel als dat van de sporenkulturen. Even wil ik hierbij nog vermelden, dat er in het weefsel van sommige vleezige houtzwammen al bijzonder veel groeikracht zit. Een doorgesneden berkenzwam, Polyporus betulinus, b.v. groeit, als men de twee doorgesneden helften weer tegen elkaar aanlegt, in enkele dagen weer geheel vast. Geen

enkele kultuur, uit 't weefsel van dergelijke houtzwammen gemaakt, mislukte.

Was kersen-agar voor den groei van 't houtzwammenmycelium uitstekend, de humuszwammen waren er allerminst mede tevreden. Ze groeiden uitermate langzaam en zeker had ik alle kulturen verloren, zoo ik niet op 't idee ware gekomen ook deze eens op eenigszins natuurlijk substraat te brengen en wel op gesteriliseerden humus. En ziet, sinds dien heeft het mycelium van alle soorten zich niet alleen daarop zeer voorspoedig ontwikkeld, doch één van haar „Clitocybe flaccida" heeft zelfs daarop kleine vruchtlichamen gemaakt.

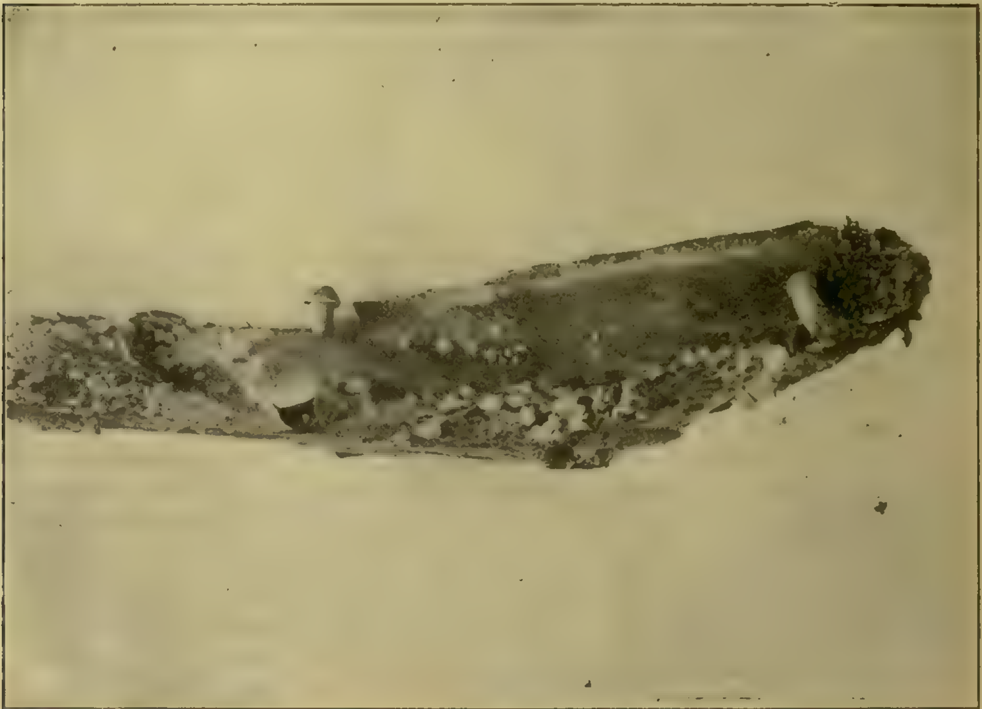


Fig. 15. Reinkultuur uit weefsel van Pleurotus ulmarius op hout.
(Ten einde beter gephotographeerd te kunnen worden, is het stuk hout uit de kolf genomen).

Brefeld zegt, dat er in de kulturen, uit sporen verkregen, wèl, op weefselkulturen *nooit* vruchtlichamen te verwachten zijn.

Ik heb daar zoo dadelijk geen geloof aan gehecht en hoopte ten minste ook hiervan wel eenig succes en niet zonder reden, daar liefst al mijn weefselkulturen van houtpaddenstoelen prachtig fructificeerden, ook al weer nadat 't mycelium gebracht was op het natuurlijk substraat: hout. Deze soorten zijn: Pholiota squarrosa (fig. 11), Hypholoma sublateritium, Polyporus betulinus, Pleurotus ulmarius (fig. 15) en Pleur. ostreatus.

Tot nog toe bleef het bij de humuspaddenstoelen met het fructificeeren

alleen bij de zooeven genoemde Clitocybe flaccida, maar nu sinds eenige maanden 't mycelium zoo goed op den humus is gaan groeien, koester ik ook daarvan de grootste verwachtingen.

Kulturen van humuspaddenstoelen uit weefsel heb ik van de volgende soorten verkregen:

Clitocybe nebularis en flaccida, Collybia butyracea, Lepiota rhacodes, Tricholoma nudum, Lycoperdon bovista, Psalliota arvense, Psalliota campestris var. bitorquus, Boletus edulis, Amanita muscaria en mappa, Geaster triplex, Phallus impudicus.



Fig. 16. Het in oidiën uiteenvallend mycelium van Collybia velutipes.

Nog te vermelden valt o. a. van één dezer kulturen, die van de fraai paarse Tricholoma nudum, dat het mycelium van deze zwam dezelfde paarse tint heeft als 't vruchtlichaam.

Bij het kweeken van al deze kulturen, bleek het mij, dat voor den groei van het mycelium een temperatuur van 16—20° C., het beste was en dat afsluiting van licht dien groei bevorderde, wat zeer goed te begrijpen is, daar de natuurlijke groei onder de aarde geschiedt.

Dat verder, om normale vruchtlichamen te verkrijgen, op dat mycelium, de temperatuur lager gesteld moet worden en wel op 12—15° C., en dat daarbij de kulturen moeten worden blootgesteld aan het directe zonlicht.

In 't duister of bij diffuus licht werden gene of slechts abnormale vruchtlichamen gevormd.

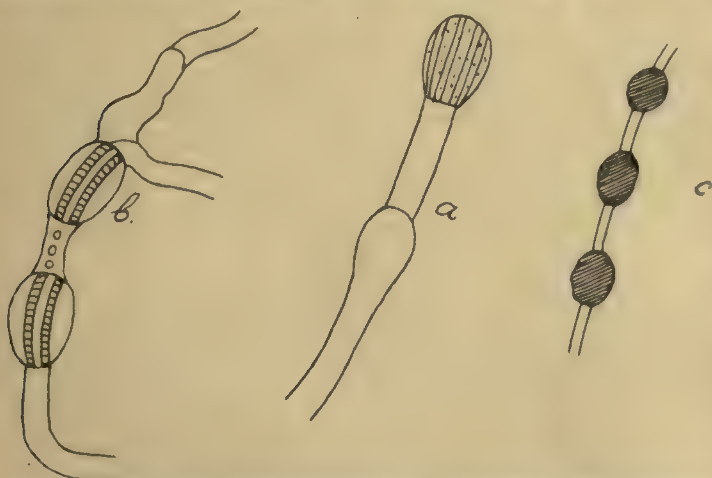


Fig. 17. Chlamydosporen (nevenfructificatie) in 't mycelium bij *a* van Stereum hirsutum; bij *b* van Lepiota rhacodes; bij *c* ketting van chlamydosporen bij Pholiota squarrosa.

Totaal kreeg ik tot nu toe 45 reinkulturen van hoogere zwammen, waarvan er 18, dat is ± 40% fructificeerden.

De vraag is nu, zal deze kweekerij ook praktisch nut geven? Zeker is het, dat we op deze manier, ik zeg niet dat het juist mij gelukken zal, een tipje van den sluier zullen kunnen oplichten die

nog bedekt het geheim van het ontstaan der vruchtlichamen en of die werkelijk gevormd worden langs den z.g.n, ongeslachtelijken weg, zooals dat voor de Hymenomyceten algemeen wordt aangenomen.

De geheele ontwikkeling toch is nu te volgen, wat door mij, door gebrek aan voldoenden tijd in de eersten en door goede kleuringsmiddelen in de tweede plaats, nog niet geheel gedaan is.

Wel heb ik reeds zeer vele interessante dingen aan het mycelium waargenomen. Zoo traden b.v. in vele der kulturen in 't mycelium plotseling bruin-gele plekken op. In 't eerst meende ik dan, dat de kulturen verontreinigd waren doch onder 't microscoop bekeken bleken 't gele, vetbevattende draden te zijn, die als z.g.n. oidiën in kleine stukjes uiteenvielen (fig. 16.) of te bestaan uit de z.g.n. „nevenfructificaties" zooals conidiën, chlamydosporen enz. (fig. 17.). Juist op die bruine plekken werden dan, na vrij korten tijd de echte vruchtlichamen gevormd.

Die nevenfructificaties gaven in kultuur gebracht dikwijls weer normaal mycelium.

Aan de myceliumdraden van bijna alle houtzwammen en enkele humus dito's komen zeer overvloedig groote of kleine meest kubische kristallen van oxaalzure kalk voor (fig. 18) en de abnormale vruchtlichamen, zooals bv. bij Polypor. bet. en Lenzites flacc. bevatten inplaats van sporen, alleen van deze kristallen in het hymenium.



Fig. 18. Kristallen van oxaalzure kalk op 't mycelium van Pholiota squarrosa.

Doch nu deze kweekerij beschouwd van een werkelijk praktische zijde en wel: zal dit, nu nog laboratoriumwerk, ook in 't groot kunnen worden voortgezet?

Het kweeken van paddenstoelen heeft al zoovele jaren de hoofden der menschen beziggehouden.

Sinds eeuwen wordt in de verschillende landen, de laatste jaren ook in ons land in enkele plaatsen, de champignon, de Psalliota campestris met hare vele varieteiten met goed gevolg gekweekt, (fig. 19) doch met al die andere zoo smakelijk eetbare soorten, zooals o.a. de morielje en het eekhorentjesbrood, de cèpe of boletus is het nog maar altijd niet gelukt. Prof. Duggar heeft (beschreven in zijn reeds vroeger genoemd boekje) jaren lang op zeer groote schaal en met de meeste zorg en toewijding getracht vele smakelijk eetbare soorten zooals, de morielje, boletus-soorten en de inktzwam Coprinus comatus, te kweeken, echter, zonder eenig gevolg.

Méer succes hebben de Japanners, die een eetbaren boompaddenstoel, Pholiota aegerita geheeten, buiten op boomen kweeken en dezen geregeld ter markt brengen.

Het is mij nu gelukt hen dit met de eetbare „winterzwam" Collybia velutipes, na te doen, d.w.z. dat ik die op een boomstronk gekweekt heb en er zoo nu en dan een maaltje af kan plukken, maar, met het aan de markt brengen ervan, zijn we nog ver af.



Fig. 19. De Heer Jan M. HULSKEN te Arnhem, bezig champignons te plukken van een zijner champignonbedden.

Doch, zoo als ik reeds opnoemde, ik heb nu in mijn bezit reinkulturen van de smakelijk eetbare soorten: Psalliota arvensis, de akker-champignon, wier smaak veel fijner nog is dan de weide dito die altijd gekweekt wordt, van Boletus edulis, het eekhoorntjesbrood; van de geliefde Suppen-pilz der Duitschers: Marasmius oreades; van de zoo voedzame en smakelijke Lycoperdon bovista, de reuzenbovist.

Zal nu *De Levende Natuur* eens prijken met afbeeldingen van keurig in een kistje geschikte exemplaren van deze soorten, klaar om aan de liefhebbers te worden rondgezonden, afbeeldingen, zooals men die nu van de champignon ziet in de reclameboekjes der champignonkweekers? Ik vrees er heel erg voor! Echter, de Heer Jan M. Hulsken, champignonkweeker in Arnhem, heeft beloofd het met mij te beproeven om deze andere soorten in het groot te kweeken en dus nog niet gewanhoopt!

Haarlem, Dec. 1912. CATHARINA COOL.

SUMMARY.

HE writer always had the conviction that all species of toadstools produced spores capable of germination. She had brought year after year, many mature specimens and not least of the beautifully coloured ones, into her garden, thinking that by sowing them in this manner, she would cultivate a little toadstool-paradise in it.

Alas! in all these years not a single species has come up. She was very curious to know if other people had succeeded better with their investigations, and working at that time at the Phytopathological Laboratory „Willie Commelin Scholten" at Amsterdam, which has a large library, she looked up the literature on the point.

The earliest paper which gives something of interest as to this, was that of Hoffmann (Ueber Pilzkeimungen 1859), the most extensive investigations are those of O. Brefeld („Bot. Untersuch. über Schimmelpilze" and „Untersuch. aus dem gesammt Geb. der Mykologie").

The conclusion of all the writers was that toadstools, which grow on trees, produce spores which germinate, but that in the case of all the species which grow in the earth, spore-germination does not take place.

After having consulted all her colleagues the writer resolved to make an extensive investigation on this point. During the space of two years she has examined the spore-germination in the „moist chamber" of *167* different species of toadstools.

Different nutrient liquids were tried of which that of boiled plum-juice was the most satisfactory; many species indeed germinated their spores in pure water. The best results were obtained with a temperature of 15—20° C. and when day-light was shut out.

The results of these investigations were, that from the *62* species of wood-toadstool, *45* germinated, that is 71%, and that from the *105* species of earth-toadstool, only *15*, that is 14%, germinated. The names of these are given on page *7*.

Some success was obtained with the spores of „Amanita mappa" (fig. 3) sown in a liquid made from leaves and earth boiled in water. The investigation with this cultural-liquid is not yet concluded.

The experiment of germinating the spores after a period of rest did not succeed at all; equally unsuccessful was an experiment with the spores of some toadstools eaten by snails which according to the investigations of Voglino (nota micologica 1891) will only germinate after having passed through the stomach of these animals.

Notwithstanding these negative results, the writer does not believe, that all these beautiful earth-living-toadstools are incapable of reproduction by their spores. She only thinks that man can not imitate the conditions under which they germinate in Nature.

She begs her mycological colleagues to follow up her germination-investigations. It gives little trouble and it is very interesting to see the different modes of germinating in the different species and when many people experiment on the same subject, perhaps one of them discover the conditions of success. In her investigations the writer tried to make pure cultures from species which possess germinating spores. For this purpose she placed the cap of the freshly gathered toadstool (facing downwards) on a wadding ring, which is placed on a sterilized glassplate or Petri dish. After some hours enough spores have fallen from the cap to be sown; this she did, by the so called: „Bacteria pure culture method", and with a nutrient substratum of cherry-agar.

From the *66* species sown, the writer obtained *22* purecultures, belonging for the greater part to the woodgrowing toadstools. Of these *22* cultures *15* species, that is 67 % give more or less normal fructifications. The first fructification to appear (5 weeks after sowing and after growing the mycelium on sterilized wood in a bottom of wet sand, was: Collybia velutipes (fig. 10).

Polyporus versicolor gives already fructification, *18* days after sowing on cherry-agar in Petridish.

As the writer could not obtain pure cultures by sowing the spores of the beautiful earth-toadstools, she adopted for them the so called „tissue culture method" described by O. Brefeld. A small piece of tissue from stem or cap was therefore cultivated on a nutrient substratum, in this case also cherry-agar.

By this method she succeeded with the earth-species as well as with the wood growing species, but only with those former which are thick-fleshy.

In general the toadstools are too watery for this method of culture and most of them make absolutely no growth in tissue-cultures. From the *150* species which the writer experimented with, only *20* that is 13% give pure cultures and *6* from those that is 30% have produced fruits. It is to be remarked, that most of the cultures, the names of which are given on page 16 and 17, are still very young and may fructify before long.

Generally the temperature in which the mycelium of all these pure cultures grew best, was from 16—20° C. and that when kept from daylight.

To produce the most normal fructifications the temperature must be below 16° (12—15°) and daylight, even sunlight, must be allowed.

Other interesting structures are shown by the mycelium both macro-and microscopic; of these we may mention, the secondary fructifications (fig. 16 and 17).

At the end of the article, the writer asks if, in addition to giving such very interesting material for study, these pure cultures of toadstools might not be put to some practical advantage?

She has separated the mycelium of the following very good edible mushrooms: „Psalliota arvensis", the common mushroom which is more tasteful than the „Psalliota campestris", „Marasmius oreades", the Fairyring toadstool; „Morchella esculenta", the common morel and „Boletus edulis" the summer Boletus.

Would it be possible to cultivate these species in a wholesale manner, as one has cultivated for so many years, the common mushroom „Psalliota campestris"? Various people have tried to do so with other species, without however any success.

Nevertheless the author will try the experiment and Mr. Jan M. Hulsken at Arnhem (whose nursery of mushrooms is given in fig. 19) will co-operate with her.